

Caracterização dos Cristais de Oxalato de Cálcio nas Partes Reprodutivas e Vegetativas Aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae)

Luciana Areal Navarro¹, Leonardo Duarte², Roberta Coelho Klein³ e Eliane Diefenthaler Heuser⁴

Introdução

Ilex paraguariensis A. St. Hil. pertence à família Aquifoliaceae, compreendendo esse gênero cerca de 400 espécies, das quais 50 ocorrem no Brasil, principalmente nos estados do Sul e Sudeste e em áreas de maior altitude [1]. Popularmente é conhecida como erva-mate, sendo árvore símbolo do Estado do Rio Grande do Sul, conforme lei nº 7439 (Rio Grande do Sul, 1980). É uma espécie dióica, com árvores perenifólias e preferencialmente umbrófila [2]. Heuser [3] observou uma grande quantidade de cristais de oxalato de cálcio, sob forma de drusas, em flores pistiladas de *Ilex paraguariensis*, no momento da fecundação. Segundo Metcalfe & Chalk [4] drusas são pequenos cristais, livremente agregados em grupos mais ou menos esféricos. A presença de cristais está relacionada a uma adaptação dos vegetais contra herbivoria, balanço iônico e ao desenvolvimento do tubo polínico, servindo como fonte para a formação desta estrutura, visto que o crescimento deste, requer gradientes intracelulares de cálcio [5, 6]. Raven & Smith [7] mencionam que o oxalato de cálcio é conhecido como um produto extremamente tóxico do metabolismo da planta e a formação de cristais de cálcio, a partir do oxalato, poderia servir como forma de eliminação. Ilarslan *et al.* [8] dizem que o oxalato de cálcio é um produto onde os íons de Ca^{2+} são derivados do meio ambiente e os íons de oxalato (ácido oxálico) são provindos do metabolismo das plantas, sendo que sua presença pode ser benéfica em uma ou mais fases do ciclo de vida dos vegetais. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os cristais de oxalato de cálcio, presentes na parte reprodutiva (flor pistilada) e vegetativa aérea de *Ilex paraguariensis*.

Material e Métodos

Foram utilizados caule (jovem), folha (pecíolo e limbo) e flor pistilada de *Ilex paraguariensis* coletados no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do estado do Rio Grande do Sul. Para análise em microscopia óptica, o material selecionado foi fixado em solução de glutaraldeído 2% e tampão fosfato 0.1 M, pH 6,8, por 48

horas. Após, desidratado em série etílica crescente, à temperatura ambiente, 15min cada. Na última etapa da desidratação, utilizou-se solução de etanol absoluto e clorofórmio, na proporção de 3:1; 1:1 e 1:3 (v/v) respectivamente. As partes vegetativas aéreas, foram incluídas em parafina histológica a 47°C, seccionadas transversalmente a 7µm em micrótomo rotativo (Leica RM 2145). As secções foram distendidas em água destilada e aderidas a lâminas histológicas sobre placa aquecedora a 50°C, e coradas com azul de toluidina 1%. As lâminas foram montadas com Entellan. Foram também realizadas secções a mão livre, coradas com azul de toluidina 1%. Para melhor visualização dos cristais de oxalato de cálcio, o material foi observado em microscopia de polarização. A identificação da composição química destes cristais, foi realizada utilizando-se solução de ácido clorídrico 10% [9], em secções de material fresco. As fotomicrografias foram obtidas através de câmera digital Nikon, modelo Coolpix 995.7,0. Para a fixação e coloração do material que se encontrava na fase reprodutiva, utilizou-se a mesma técnica do material que se encontrava na fase vegetativa. Como meio de inclusão foi utilizado hidroxietilmetacrilato (Historesina Jung) [10], sendo polimerizada à temperatura ambiente. O material foi seccionado longitudinalmente, com espessura de 4 a 8 µm, em micrótomo de guias, marca Leitz, modelo 1400, equipado com navalha de aço, tipo D. As secções foram distendidas em água destilada à 28°C e aderidas à lâminas histológicas sobre placa aquecedora, marca Olidef, modelo CZ.

Resultados e Discussão

No caule (ramos jovens) em secção transversal, foram observados cristais de oxalato de cálcio em forma de monocristais, dispersos na região medular (fig. 1A), porém não foram encontradas drusas. Ao redor do feixe vascular do pecíolo, foi possível visualizar uma concentração elevada de cristais em forma de drusas (fig. 1B e 1C) e monocristais, também observados por Prychid & Rudall [11] estando estes envolvidos no transporte de Ca^{2+} através do xilema. No mesofilo ocorre menor deposição de oxalato de cálcio, sob forma de

1. Estagiária na área de Botânica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Campus Universitário Central. Av. Ipiranga, 668, prédio 12, bloco 12C, sala 247, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. e-mail: lucianaanavarro@gmail.com.

2. Estagiário na área de Botânica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Campus Universitário Central. Av. Ipiranga, 668, prédio 12, bloco 12C, sala 247, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. e-mail: lynuzcirce@hotmail.com

3. Estagiária na área de Botânica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Campus Universitário Central. Av. Ipiranga, 668, prédio 12, bloco 12C, sala 247, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. e-mail: robertakleinbio@hotmail.com

4. Professora Doutora da Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Campus Universitário Central. Av. Ipiranga, 668, prédio 12, bloco 12C, sala 247, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. e-mail: eheuser@puers.br.

drusas (fig. 1D), não sendo visualizados monocristais. Drusas aparecem em concentrações maiores na nervura mediana das folhas. Acredita-se que as inclusões de oxalato de cálcio, no caule e no pecíolo tenham função de proteção contra herbivoria, balanço iônico e suporte estrutural [5, 6]. Nas flores pistiladas, em secção longitudinal, observou-se a presença de oxalato de cálcio sob forma de drusas, no tecido transmissor (fig. 1E e 1F), próximo ao tecido de condução. Estes cristais ocorrem até a região próxima ao lóculo (fig. 1E), sendo encontrados novamente no rudimento seminal, junto à micrópila. Ilarslan *et al.* [8] demonstram a existência de um gradiente de cálcio, pelo qual o tubo polínico é “conduzido”, através do tecido transmissor até o canal micropilar, para que inicie o processo de fecundação. Para McAnish & Hetherington [12], os cátions de Ca^{2+} são mensageiros intracelulares secundários que captam grande quantidade de estímulos externos e que desencadeiam respostas específicas em células vegetais. Refere-se ao aumento da taxa de Ca^{2+} em tubos polínicos em desenvolvimento. Uma fonte de cálcio provém da sinérgide que degenera antes da penetração do tubo polínico, sendo que altas concentrações de cálcio também foram encontradas nas sinérgides não penetradas [8]. Kapil & Bhatnagar [13] afirmam que se estabelece um gradiente de concentração que auxilia na passagem do tubo polínico através da sinérgide degradada. Com a realização do presente trabalho, foi possível observar que *Ilex paraguariensis* apresenta, na flor pistilada, deposições de oxalato de cálcio em forma de drusas. Já nas partes vegetativas aéreas, foram visualizadas deposições de oxalato de cálcio, sob forma de monocristais e drusas.

Referências

- [1] SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odesa: Inst. Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 640p.
- [2] COELHO, G.C., 1995. *Anatomia foliar e morfologia de inflorescência das espécies rio-grandenses de Ilex L.* (Aquifoliaceae). Poa. 101p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – UFRGS.
- [3] HEUSER, E.D., 1999. *Embriogênese em Ilex paraguariensis St. Hil. aspectos do suspensor e endosperma*. Poa. 145p. Dissertação (Doutorado em Botânica) – UFRGS.
- [4] METCALFE, C.R. & CHALK, L. 2004. *Anatomy of the Dicotyledons*. Ed. 2. Oxford: Clarendon, v. 3, p.82-97.
- [5] MESSERLI, M.A.; CRETON, R.; JAFFE, L.F.; ROBINSON, K.R. 2000. Periodic Increases in elongation rate precede increase in cytosolic Ca^{2+} during pollen tube growth. *Developmental Biology*, 222: 84-98.
- [6] HOLDAWAY-CLARKE, T.L.; WEDDLE, N.M.; KIM, S.; ROBIA, A.; PARRIS, C.; KUNKEL, J.G. & HEPLER, P.K. 2003. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *Journal of Experimental Botany*, 54: 65-72.
- [7] RAVEN, J.A. & SMITH, F.A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76: 415-431.
- [8] ILARSLAN, H.; PALMER, R.G.; IMSANDE, J.; HORNER, H.T., 1997. Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (Leguminosae). *Amer. J. Bot.*, 84: 10422-1046.
- [9] KRAUS, J.E.; ARDUIM, M., 1997. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. EDUR, 198p. Seropédica, RJ.
- [10] GERRITS, P.O. & SMID, L., 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, 132 (1): 81-85.
- [11] PRYCHID, C.J. & RUDALL, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84: 725-739.
- [12] McANISH, M.R.; HETHERINGTON, A.M., 1998. Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends in Plant Science*, 3 (1): 32-36.
- [13] KAPIL, R.N.; BHATNAGAR, A.K., 1981. Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. *International Review of Cytology*, 70: 291-341.

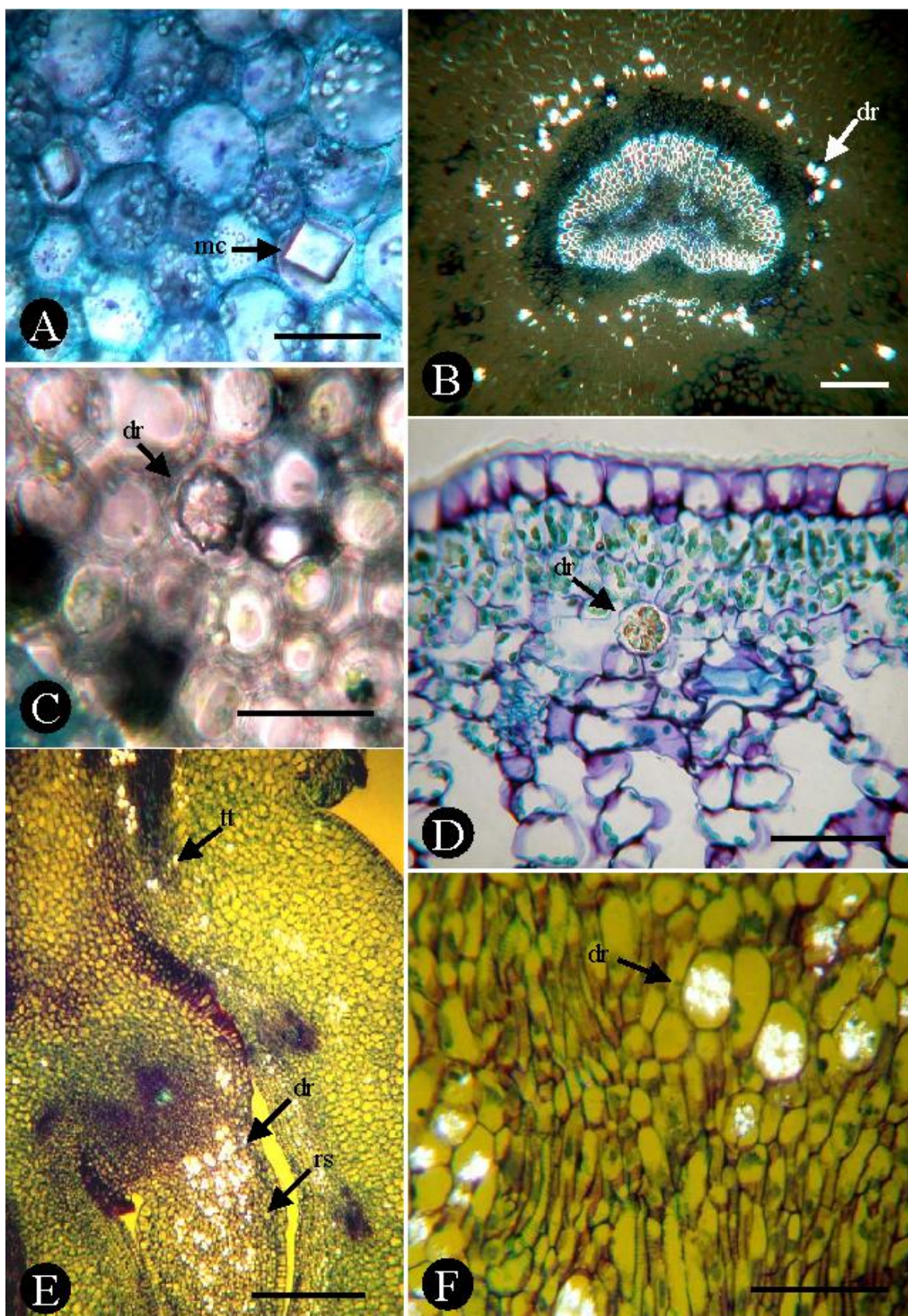


Figura 1. Fotomicrografias de *Ilex paraguayensis* A. St. Hil. (A) caule com monocristais (mc), em secção transversal; (B e C) microscopia de polarização do pecíolo, em secção transversal; (B) drusas (dr) na região periférica do feixe vascular; (C) detalhe da figura B (drusa- dr); (D) folha (mesófilo) com drusa (dr), em secção transversal; (E e F) microscopia de polarização da flor pistilada, em secção longitudinal; (E) aspecto do tecido transmissor (tt) e rudimento seminal (rs), com drusas (dr); (F) detalhe do tecido transmissor (tt) contendo drusas (dr). Fig. 1A, 20µm; Fig. 1B, 50µm; Fig. 1C, 10µm; Fig. 1D, 20µm; Fig. 1E, 20µm; Fig. 1F, 10µm.